

Characterization and Purification of Lepidimoide-Producing Enzymes from *Colletotrichum* sp. AHU9748

(*Colletotrichum* sp. AHU9748 由来レピジモイド生産酵素の
精製とその特徴)

学位論文内容の要旨

レピジモイド (Lp) は発芽したクレスの種や他の植物成分から抽出されるアレロパシー物質(感
化物質)である。植物の成長・発育に及ぼす様々な影響やその化学合成については報告されているが、
Lp生産に関わる酵素についての報告は未だない。当研究室では、副産物(エピマー)の生成を伴い化
学試薬を大量に使用した複雑なステップからなる化学合成ではなく、単純にオクラ多糖を微生物分解
することによりLp生産を効果的に行うことを考え、分離保存した植物内生菌からスクリーニングによって
Colletotrichum 属真菌 AHU9748 株を得た。オクラの粘性物質に含まれる多糖から本菌株によって生
産されるオリゴ糖は、MS, NMRなど物理化学的測定によりLpであることが明らかにされた。そのアレロ
パシー効果や、様々な植物及び他の生物に対する作用機構の解明、生物学的制御資材としての可能
性を追求する上で、Lpの大量生産は必須の課題である。さらに、Lp生産微生物酵素の特徴を明らか
にし、生成プロセスを解析することは、大量生産だけでなく、植物内生菌が病徴を表すことなく植物組
織に侵入するための戦略を理解する上で重要である。本研究では、オクラ多糖からのLp生産に必要と
される *Colletotrichum* sp. AHU9748 株由来の酵素を精製後、酵素の特徴を明らかにし、Lpの生成機
構を解明すると共に効果的な微生物によるLpの生産を目的とした。

1. 使用したオクラ多糖は、*Abelmoschus esculentus*, Moench の未熟な実の粘性物質から友田らの方法
に従い抽出された。オクラ多糖の主鎖を作る六糖から成る繰り返し構造は、Rhamnose の 4 位に
4-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactopyranose を側鎖として持ち、(α 1 \rightarrow 4) GalA (α 1 \rightarrow 2) Rha の繰り返し
構造を持つと言われている。ラムノース、ペクチン、キシランなどを誘導物質あるいは基質としてLp生産
を調べた結果、ペクチンから多少Lp生産酵素が誘導され、またオクラ多糖から誘導された酵素によりペ
クチンからも少量のLp様物質が生成されたが、Lp生産のための酵素誘導物質としてまた基質としてオ
クラ多糖が最適であった。

2. Lp生産酵素は、0.25%オクラ多糖を単一炭素源し、この菌株を 60 時間培養した後に誘導された。
粗酵素によるLp生成反応の至適pH及び温度はそれぞれ 5.0-7.0、30-40°C であった。*Colletotrichum*
sp. AHU9748 株のオクラ多糖誘導粗酵素を用いた酵素反応では、オクラ多糖から 2 時間以内にLp生
産を開始し、その後 16 時間後まで生産量が増加しその後は定常状態となった。Lp生産は、培養上清

と菌体の両方から調製された粗酵素で可能であったが、その生産量は上清からの粗酵素で非常に多かった。またpH3 からpH10 の間で粗酵素のLp生産活性安定性を調べた結果、3.0 及び 6.0 で不安定であったため、酵素精製はpH8.0 の緩衝液と4℃で行われた。

3. 最初の精製で、オクラ多糖からのLp生産には 2 つ以上の酵素が関与することが予測された。これらの酵素を決めるため、Lpの生産量と共に、オクラ多糖の構造からLp産生に必要と我々が予想した β -galactosidase (β -gal)、rhamnogalacturonan lyase (RG-lyase)、acetylsterase (AE)活性を測定しながら、培養上清を硫酸沈殿後、カラムクロマトグラフィーにより分画し、Resource Q カラムから連続して分画された、Lpを最も多く生産する画分とわずかに生産する画分及び非生産画分を得た。Lpを最も多く生産する画分には β -gal、RG-lyase、AE 活性が共に見られたが、非生産画分では高生産画分に比べ β -gal、RG-lyase 活性が低かった。Lpを生産する画分から SDS-PAGE 上で分離した 3 個のタンパク質のN末端アミノ酸配列を読み、その相同配列をデータベース上で検索したところ、Lp生産画分に β -gal、RG-lyase、AE が存在することを裏付ける結果となった。

4. オクラ多糖で誘導された培養上清からカラムクロマトグラフィーにより RG-lyase とAEを精製した。得られたRG-lyase とAEのうちRG-lyaseのみをそれぞれ、Resource Q カラムから得られたLp非生産画分とわずかにLpを生産する画分に加えた所、RG-lyase、 β -gal 活性が共に低いLp非生産画分ではLpを生産せず、Lp生産が最も高い画分に比べ RG-lyase 活性のみが低くわずかにLpを生産した画分では、その生産性が 5 倍になった。これらの結果から RG-lyase と β -gal 活性が共にLp生産には必須であることが明らかとなった。しかし、わずかなLp生産画分には、SDS-PAGE 上で分離される 85 kDa のタンパク質も存在せず、RG-lyase 添加後もLp生産は高Lp生産画分の生産量に匹敵するものではなかった。高Lp生産画分にさらに精製 RG-lyase を加えたが、著しいLp生産の上昇は見られなかった。これらの結果から、Resource Q カラムで分画された高Lp生産画分に含まれかつ SDS-PAGE 上で分離される 85 kDa の未同定タンパク質が、 β -gal、RG-lyase、AE のほかに、Lp生産の最初か最後の段階で重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。

5. Fry ら(1993)は、 4)-GalA-(1 \rightarrow 2)-Rha-(1 \rightarrow),の繰返し構造を持った rhamnogalacturonan のようなペクチン多糖の分解により二糖類 Δ GalA-(1 \rightarrow 2)-Rha を得るためには lyase や endorhamnosidase が必要であろうと推測していた。オクラ多糖のように主鎖を作る六糖繰返し構造に 4-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactopyranose を側鎖として持ち、中に(α 1 \rightarrow 4) GalA (α 1 \rightarrow 2) Rha,がある場合、これを基質としてLpを生成するためには β -galも重要であることを我々は実験的に明らかにした。

最後に、これらの実験結果から、Lp生産のための微生物酵素として、 β -galとRG-lyaseやAEなどの rhamnogalacturonan 分解酵素が重要であると結論付けた。先の吉村の実験では50株の植物内生菌と8株の植物内生細菌中29株の真菌が、オクラ多糖から多かれ少なかれLp様二糖類を産生することが明らかになっている。これらの結果は、植物内生菌が植物の細胞物質から植物ホルモンのように振舞う二糖類を比較的高頻度で生産する事を示唆した。Lp生産画分にさらに RG-lyase だけを加えても、著しいLp生産の向上は見られなかったが、これらの結果が微生物酵素によるより効果的なLp大量生産に貢献することを期待してやまない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 教 授 木 村 淳 夫

副 査 講 師 曾 根 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Characterization and Purification of Lepidimoide-Producing Enzymes from *Colletotrichum* sp. AHU9748

(*Colletotrichum* sp. AHU9748 由来レピジモイド生産酵素の
精製とその特徴)

本論文は英文 105 頁、図 31、表 11、9 章からなり、参考論文 3 編が付されている。

レピジモイド (Lp) は発芽したクレスの種などから抽出されるアレロパシー物質である。植物の成長・発育に及ぼす様々な影響やその化学合成については報告されているが、Lp 生産に関わる酵素についての報告は未だない。当研究室では、オクラ多糖の微生物分解により Lp を生産することを考え、東南アジアの植物内生菌から *Colletotrichum* 属真菌 AHU9748 株を選抜した。オクラの粘性物質に含まれる多糖から本菌株によって生産されるオリゴ糖は、MS、NMR など物理化学的測定により Lp であることが確かめられた。その、アレロパシー効果、作用機構の解明や生物資材としての可能性を追求する上で、Lp の大量生産は必須の課題である。さらに、Lp 生産微生物酵素の特徴を明らかにし、生成プロセスを解析することは、植物内生菌が、病徴を表すことなく植物組織に侵入するための戦略を理解する上でも重要である。本研究では、オクラ多糖からの Lp 生産に必要とされる *Colletotrichum* sp. AHU9748 株由来の酵素を精製後、酵素の特徴を明らかにし、Lp 生成機構の解明を目的とした。

1. 使用したオクラ多糖は *Abelmoschus esculentus*, Moench の未熟な実の粘性物質から友田らの方法に従い抽出された。オクラ多糖主鎖の六糖から成る繰り返し構造は、Rhamnose の 4 位に 4-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactopyranose を側鎖として持ち、(α 1 \rightarrow 4) GalA (α 1 \rightarrow 2) Rha の繰り返しがあると言われている。Lp 生産酵素は、0.25% オクラ多糖を単一炭素源し、この菌株を 60 時間培養した後に誘導され、基質としてもオクラ多糖が最適であった。粗酵素による Lp 生成反応の至適 pH 及び温度はそれぞれ 5.0-7.0、30-40°C であった。*Colletotrichum* sp. AHU9748 株の誘導粗酵素を用いた酵素反応では、オクラ多糖

からの L p 生産量が 16 時間後まで増加し、その後は定常状態となった。L p 生産は上清からの方が多く pH3.0 及び 6.0 で不安定であったため、酵素精製は pH8.0、4℃で行われた。

2. 最初の精製で、オクラ多糖からの L p 生産には 2 つ以上の酵素が関与するのだろうと予測された。これらの酵素を決めるため、L p の生産量と共に、オクラ多糖の構造から L p 産生に必要と予想される、 β -galactosidase (β -gal)、rhamnogalacturonan lyase (RG-lyase)、acetylsterase (AE) 活性を測定しながら、培養上清を硫酸沈殿後、カラムクロマトグラフィーを行った。Butyl Sepharose 及び Q Sepharose カラムで溶出された L p 活性画分では、高い β -gal、RG-lyase、AE 活性を伴った。最終的に、Resource Q カラムから L p を最も多く生産する画分と、わずかに生産する画分及び非生産画分を連続的に得た。L p を最も多く生産する画分には、高い β -gal、RG-lyase、AE 活性が共に見られたが、非生産画分では高生産画分に比べ β -gal、RG-lyase 活性が低かった。L p を生産する画分から SDS-PAGE 上で分離した 3 個のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を読み、その相同配列をデータベース上で検索したところ、L p 生産画分に β -gal、RG-lyase、AE が存在することを裏付ける結果となった。

3. オクラ多糖で誘導された培養上清から RG-lyase と AE を精製した。得られた RG-lyase を RG-lyase、 β -gal 活性が共に低い L p 非生産画分に加えても L p を生産しなかった。L p 生産が最も高い画分に比べ、RG-lyase 活性のみが低くわずかに L p を生産する画分に RG-lyase を加えると、L p 生産は 5 倍に上昇した。これらの結果から RG-lyase と β -gal 活性が共に、L p 生産には必須であることが明らかとなった。しかし、RG-lyase 添加後の L p 生産は、高 L p 生産画分に匹敵するものではないことから、この RG-lyase が、繰り返し構造中のすべての rhamnogalacturonan (RG) 間の 1, 4 結合を β -elimination を伴って加水分解するのではないと考えられた。末端の rhamnose を切り離す加水分解酵素などのような他の酵素も必要と思われた。Resource Q カラムで分画された高 L p 生産画分に含まれ、かつ SDS-PAGE 上で分離される 85 kDa の未同定タンパク質が、 β -gal、RG-lyase、AE のほかに、L p 生産の最後の段階で重要な役割を果たしている可能性がある。

以上、本研究では、オクラ多糖のように 4-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactopyranose を側鎖として持つ RG を基質とし、*Colletotrichum* sp. AHU9748 株由来の微生物酵素を利用して、L p を生成するための条件を検討し、さらには、 β -gal と、RG-lyase や AE などの RG 分解酵素、及び未同定の 85KDal のタンパク質が重要であることを明らかにした。RG の脱アセチル化はその後の主鎖の加水分解には必須であることが報告されている。予測される酵素反応として、まず、AE と RG-lyase がオクラ多糖にはたらき、いくつかの RG 小断片にした後、 β -gal や他の未同定の酵素が、これらの断片から L p を切り出すのではないかと考えた。これらの成果は微生物酵素によるより効果的な L p 生産や、植物内生菌の侵入・共生戦略の理解に大きく寄与するものと思われる。

よって審査員一同は、サランブルテー・チャヤポーンが博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。